

THESES
présentées à
LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS
pour l'obtention du titre
de DOCTEUR de l'UNIVERSITE
de PARIS
(mention Sciences)

par M. adame Janine, P A R L E B A S

Sujet de la 1ère Thèse Etude chimique et immunologique d'une nouvelle
glycoprotéine de la cornée.

Sujet de la 2è Thèse Etude comparative des glycoprotéines dans
différents tissus d'origine conjonctive.

Soutenues le 13 juin 1969 devant la Commission

composée de : Président : Mademoiselle le Professeur V E I L

Examineurs : Monsieur le Professeur P I C O N
Monsieur le Professeur H A L P E R N

Invité : Monsieur le Docteur R O B E R T.



THESES
présentées à
LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS
pour l'obtention du titre
de DOCTEUR de l'UNIVERSITE
de PARIS
(mention Sciences)

par M. adame Janine P A R L E B A S

Sujet de la 1ère Thèse Etude chimique et immunologique d'une nouvelle
glycoprotéine de la cornée.

Sujet de la 2è Thèse Etude comparative des glycoprotéines dans
différents tissus d'origine conjonctive.

Soutenues le 13 juin 1969 devant la Commission

composée de : Président : Mademoiselle le Professeur V E I L

Examineurs : Monsieur le Professeur P I C O N
Monsieur le Professeur H A L P E R N

Invité : Monsieur le Docteur R O B E R T.

THESE
Présentée à
LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS
pour l'obtention du
DIPLÔME DE L'UNIVERSITÉ
(Mathématiques)
Digitized by the Internet Archive
in 2026

Étude chimique et immunologique d'une nouvelle glycoprotéine de la cornée

par

Janine PARLEBAS (1)

*Institut d'Immunobiologie (I.N.S.E.R.M.) (Directeur: Pr B. N. HALPERN),
Hôpital Broussais, Paris-14^e*

I. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE

SUMMARY

*A chemical and immunological study of a new glycoprotein
of the cornea*

I. Biochemical research

The physico-chemical research we undertook consisted, in the first instance, of finding an adequate extraction method for the sugar-protein complexes characteristic of glycoproteins.

The successive elimination of the various constituents, especially the acid mucopolysaccharides and soluble proteins using a strongly ionic buffer with a sodium chloride base, followed by a moderate degree of hydrolysis by means of a 2.7 % trichloroacetic acid solution to eliminate collagen, has enabled us to begin research into another insoluble constituent: KGAG, soluble only in 8 mole urea. This method of extraction avoids the disadvantages of drastic hydrolysis and allows the substance to be isolated with the minimum deterioration. The structural glycoprotein isolated in this way is characterized by the presence of a small quantity of hexoses and hexosamines (6.9 % hexoses, 2.16 % hexosamines), a small quantity of sialic acid (0.04 %) and by the absence of uronic acids.

The aminoacid composition is characterized by the absence of hydroxyproline, the presence of hydroxylysine and alcohdroxylysine together with a relative richness in aromatic aminoacids. The diacid aminoacids and glycooll form the greater part of the aminoacid residues.

The bio-physical characteristics show an apparently homogeneous substance, polydispersible to a certain extent, with an electrophoretic mobility analogous with that of an α -2-globulin and a molecular weight of about 100,000.

* * *

(1) Thèse soutenue le 13 juin 1969 pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Paris (Sciences).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'un des grands problèmes de la biologie moderne est de comprendre le fonctionnement des organismes en partant de leur composition chimique et en explicitant les mécanismes en terme de structure et conformation moléculaire.

Le tissu conjonctif joue un rôle important à tous les stades de l'histogenèse et de l'organogenèse. Toute une série de mécanismes de régulation dont nous commençons seulement à entrevoir la complexité, assure aux fibroblastes leurs capacités d'adaptation multiple dont le résultat est un tissu de soutien parfaitement adapté aux besoins de l'organe mésenchymateux ou de tissu de soutien dont il assure l'intégration morphologique et fonctionnelle.

Avant de comprendre ces mécanismes de régulation, il est nécessaire de connaître la composition du tissu conjonctif dans toutes ses formes spécialisées. Le travail que nous présentons s'inscrit surtout dans ce chapitre descriptif de la biochimie du tissu conjonctif. Les substances qui composent ce tissu sont en ligne générale des complexes sucre-protéine très étroitement liés les uns aux autres et difficilement solubles.

Cela nous a amené à mettre au point une technique sélective d'extraction afin de pouvoir isoler une nouvelle glycoprotéine de la cornée liée au stroma insoluble. Cette glycoprotéine que nous avons dénommée glycoprotéine de structure ou KGAG (KERATOGLYCOSAMINOGLYCANE), a été isolée et purifiée afin de déterminer ses propriétés bio-physiques (spectre d'absorption, mobilité électrophorétique, ultracentrifugation) et biochimique (composition de la copule glucidique, composition en amino-acides).

Nomenclature et définition des glycoprotéines du tissu conjonctif :

Nous croyons utile avant d'aborder notre travail, de définir les principaux constituants du tissu conjonctif et de préciser la terminologie afin de situer l'étude de la substance qui fait l'objet du présent travail.

D'après J. T. RANDALL (1953) on décrit 4 groupes principaux de composants :

1. — *Le collagène* est la protéine quantitativement la plus importante qui forme la texture des fibres conjonctives et dont la composition en aminoacides est très particulière :

- abondance d'acides-amino hydroxylés;
- 1/3 d'acides-imino (OH-proline et proline);
- 1/3 de glycine;
- absence de cystéine et tryptophane;
- faible teneur en acides-amino aromatiques.

L'unité structurale de la fibre conjonctive est le tropocollagène (p.m. 300 000) qui comporte trois chaînes peptidiques enroulées dans une triple spirale.

2. — *L'élastine* qui est une autre protéine fibreuse du tissu conjonctif, quantitativement moins importante, est très riche en amino-acides aliphatiques et en amino-acides pontiques comme la desmosine et la lysodesmosine (S. M. PARTRIDGE, 1953). On la trouve surtout dans les tissus à prédominance élastique.

3. — *Les mucopolysaccharides acides* riches en acides uroniques et en esters sulfates, étudiés surtout par MEYER, KENT et ANDERSON (1965).

4. — *Les glycoprotéines de structure* dont nous allons préciser plus loin les caractéristiques (P. W. KENT, 1967) (L. ROBERT et B. ROBERT, 1965).

Les rapports entre les différents constituants sont à la base de la diversité fonctionnelle des tissus d'origine conjonctive.

Notions et composition chimique des glycoprotéines

Le nom de glycoprotéines a été réservé à une catégorie de substances dont les principales caractéristiques selon KENT (1967), sont de contenir dans leur molécule des sucres, des sucres aminés et de l'acide sialique. La liaison sucre-protéine étudiée par NEUBERGER, MARSHALL et GOTTSCHALK (1966) se fait par l'intermédiaire de la N-acétylglucosamine qui forme une liaison peptidique avec l'asparagine. On décrit aussi des liaisons osidiques entre les amino-acides hydroxylés et les sucres (RODEN et LINDHAL, 1965, 1967).

Leur composition en amino-acides étudiée par HASHIMOTO et PIGMAN (1962) est caractérisée par l'abondance de glycine, sérine et thréonine. Les glycoprotéines ont été isolées de différents tissus (en particulier du tissu conjonctif), des hématies, des glandes digestives, etc... Leur structure bien que voisine varie selon le nombre et la composition des groupes prosthétiques sucres-protéines, la diversité de la composition protéique, le contenu en oses (GOTTSHALK, 1962).

Le degré de polymérisation des glycoprotéines est variable d'où leur polydispersion : ce phénomène explique comment on peut trouver dans le même solvant des glycoprotéines de différentes tailles moléculaires et de même composition chimique.

Elles ont été particulièrement étudiées par GOTTSCHALK, SPIRO (1963), HERRING et KENT (1963) dans la substance osseuse, FISKIN et BERENSON (1961) dans le tissu granulomateux et RADHAKRISHNAMURTHY, dans l'appareil cardio-vasculaire.

Les glycoprotéines de structure

Nous classons dans cette catégorie toutes les glycoprotéines solidement associées à la trame fibreuse du tissu conjonctif. En effet, quand on débarrasse un tissu conjonctif de tous ces constituants solubles par extractions répétées avec des solvants variés, la trame fibreuse insoluble contient encore des quantités importantes de glyco-

protéines. La partie expérimentale de ce travail se rapporte à cette classe de glycoprotéines, exclusivement.

Bien que les travaux de DISCHE aient révélé l'existence de glycoprotéines distinctes des mucopolysaccharides acides du tissu conjonctif (Z. DISCHE, A. DANILCZENKO et G. ZELMENIS, 1958), ce n'est qu'à la suite des travaux entrepris en 1960, commencés dans les laboratoires de DISCHE et poursuivis à l'Institut d'Immunobiologie, que l'individualité biochimique et métabolique de ces substances a pu être précisée (L. ROBERT et Coll., 1965).

En effet, les méthodes drastiques utilisées jusque là (hydrolyse acide ou alcaline à forte concentration) permettaient de libérer ces glycoprotéines fortement attachées aux protéines fibreuses du tissu conjonctif comme le collagène et l'élastine. Les préparations ainsi obtenues étaient, par le fait de la destruction protidique, artificiellement enrichies en sucre.

En utilisant, comme nous l'avons démontré dans ce travail, une méthode moins violente, nous avons obtenu des préparations de glycoprotéines de structure riches en protides et ne contenant que 2 à 10 p. 100 d'osides. Ces glycoprotéines de structure ont été isolées à partir de tous les types de tissu conjonctif. L'étude de leur composition a confirmé leur individualité biochimique.

La mieux caractérisée des glycoprotéines de structure est celle que nous avons isolée du stroma cornéen et dont nous réservons pour la partie expérimentale, la description de sa composition.

Matériel et Méthodes

Comme le stroma cornéen représente 9/10 de la cornée, toutes nos études et recherches portent sur le tissu conjonctif du stroma cornéen.

EXTRACTION, FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION DE LA KGAG

Pour l'extraction et le fractionnement de la totalité des composants macromoléculaires de la trame fibreuse, nous avons utilisé une méthode personnelle (L. ROBERT, Z. DISCHE, 1963); (B. ROBERT, J. PARLEBAS, L. ROBERT, 1963).

Le but de cette méthode était d'obtenir le maximum de sélectivité dans l'extraction avec le minimum de dégradations.

A. — EXTRACTION

Matériel et Méthodes

Nous avons employé pour l'extraction de la KGAG, des cornées de différentes espèces animales : Lapin, Veau, Cheval. Les yeux sont prélevés immédiatement après la mort de l'animal et congelés dans la neige carbonique (1). Chaque cornée est ensuite

(1) Ces yeux ont été fournis par les Laboratoires « Sorgia » de la Villette.

découpée soigneusement, bien nettoyée et grattée afin d'en éliminer l'endothélium et l'épithélium. Les cornées ainsi prêtes pour l'extraction sont pesées. Le poids sec de la cornée est déterminé avant toute extraction afin de pouvoir donner le rendement des différentes fractions.

Les sclérotiques qui nous serviront pour des études comparatives sont également conservées et subiront le même type d'extraction.

LES SOLVANTS utilisés pour l'extraction sont les suivants :

a) *Tampon CTC*. Pour le préparer on part des solutions stock suivantes :

- chlorure de calcium à 20 p. 100;
- Tris (Trihydroxyméthylaminométhane) Molaire;
- acide citrique Molaire.

On mélange 100 ml de CaCl_2 avec 10 ml de Tris et 2 ml d'acide citrique et on complète à 200 ml avec de l'eau distillée. On ajuste le pH à 8 avec la solution de Tris. La concentration finale de CaCl_2 est de l'ordre de 1 Molaire, celle de Tris de 0,05 M et l'acide citrique de 0,01 M. Ce mélange est toujours fraîchement préparé.

b) *Acide trichloracétique ou ATC*. On prépare une solution stock à 100 p. 100 qu'on dilue avec de l'eau à la concentration voulue. Pour la plupart des extractions de la cornée, nous avons utilisé une concentration finale de 2,7 p. 100.

c) *Urée 8 Molaire* est préparée à partir de l'urée cristallisée très pure, par dissolution dans l'eau bi-distillée. Pour certaines extractions, on ajoute à l'urée du mercapto-éthanol à une concentration finale de 0,1 Molaire.

d) *Potasse éthanolique* préparée en mélangeant la potasse à 5 p. 100 (concentration finale) dans l'éthanol aqueux à 80 p. 100.

Pour une production suffisante de glycoprotéines de structure, il faut partir environ de 200 à 300 cornées, ce qui représente environ 25 grammes de cornées fraîches pour le lapin et environ 90 grammes pour le veau ou le cheval.

Dans cet exposé, nous utiliserons les abréviations suivantes :

- CTC : chlorure de calcium-Tris-acide citrique (solution de chlorure de calcium à 10 p. 100 tamponnée à pH 8 avec du Tris 0,05 M et de l'acide citrique 0,01 M).
- TRIS : trihydroxyméthylaminométhane.
- CSC : crude soluble collagen ou collagène soluble brut.
- ATC : acide trichloracétique.
- KGAG : kératoglycosaminoglycane.

Pour l'extraction proprement dite, les cornées sont plongées dans une solution fraîchement préparée de tampon CTC et agitée pendant 12 heures à 4 °C, dans ce tampon.

Elles sont ensuite broyées au « Turmix » à grande vitesse pendant 1 minute environ et remises en agitation pendant 12 heures à 4 °C. Après centrifugation, le surnageant est gardé à froid et le stroma cornéen remis en suspension dans le même tampon, de nouveau broyé et agité pendant 12 heures à 4 °C. Après centrifugation le surnageant est décanté et le stroma subit de nouveau une extraction que nous allons répéter de façon identique six à sept fois.

Les surnageants sont dialysés contre de l'eau courante pendant 48 heures et contre de l'eau distillée à + 4 °C pendant 3 jours, en changeant l'eau de dialyse 2 à 3 fois par jour.

Dans ces surnageants que nous appelons « extraits CTC », nous avons solubilisé la quasi totalité des protéines, des mucopolysaccharides acides et du collagène soluble de la cornée.

Pendant la dialyse, on observe la précipitation d'une partie de l'extrait CTC que nous avons séparé par centrifugation. Ce précipité qui contient surtout le collagène solubilisé par le tampon CTC, sera désigné sous le nom de CSC.

Après cette série d'extractions, le stroma cornéen insoluble dans le CTC, contient encore les protéines et le collagène insolubles, dont la glycoprotéine de structure de la cornée.

Pour extraire le collagène insoluble nous effectuons une hydrolyse ménagée dans l'acide trichloracétique à 2,7 p. 100 (concentration finale) à 90 °C.

Les stromas cornéens après avoir été lavés dans de l'eau distillée sont additionnés de ATC à 100 p. 100 afin d'avoir une concentration finale de 2,7 p. 100 et chauffés pendant 5 minutes dans un bain-marie à 90 °C. Après refroidissement à la température du laboratoire, on centrifuge 15 minutes à 5 000 tours par minute environ à +15 °C. Le surnageant est gardé et le résidu est repris à nouveau dans l'ATC à 2,7 % et chauffé dans les mêmes conditions pendant 25 minutes avec agitation. Après refroidissement et nouvelle centrifugation, le deuxième surnageant est réuni au premier et le résidu est chauffé à nouveau dans l'ATC à 2,7 % dans les mêmes conditions et pendant 30 minutes.

Les surnageants trichloracétiques réunis sont mis à dialyser contre de l'eau courante et ensuite contre de l'eau distillée en changeant 2 à 3 fois l'eau de dialyse.

L'extraction dans l'ATC transforme le collagène insoluble du stroma en gélatine et permet ainsi sa solubilisation.

Après ces traitements, il reste toujours un résidu insoluble. Afin d'extraire ce résidu insoluble dans l'ATC, nous procédons comme suit :

Le résidu est lavé 2 à 3 fois dans de l'eau distillée puis mis en suspension dans une solution d'urée 8 M. L'homogénéisation est effectuée dans un broyeur à piston type « Potter » puis mis en agitation pendant 12 heures à la température du laboratoire. Après centrifugation, nous répétons 3 à 4 fois ces extractions dans l'urée 8 Molaire afin de solubiliser la plus grande partie de ce résidu. Les surnageants d'extractions à l'urée sont réunis et mis à dialyser jusqu'à disparition complète de l'urée.

De ces différents extraits, une partie est gardée à basse température et une autre lyophilisée. Après les extractions dans l'urée, il persiste encore un petit résidu contenant entre autres des pigments chromogènes. Ce résidu insoluble dans l'urée peut

être mis en solution par agitation à la température du laboratoire, dans la potasse éthanolique. La solution ainsi obtenue est neutralisée avec l'acide perchlorique, le perchlorate de potassium précipité est éliminé par centrifugation et le surnageant concentré par évaporation pour éliminer l'éthanol.

Après cette série d'extractions : CTC, ATC, Urée et Potasse éthanolique, nous solubilisons entièrement le stroma de la cornée.

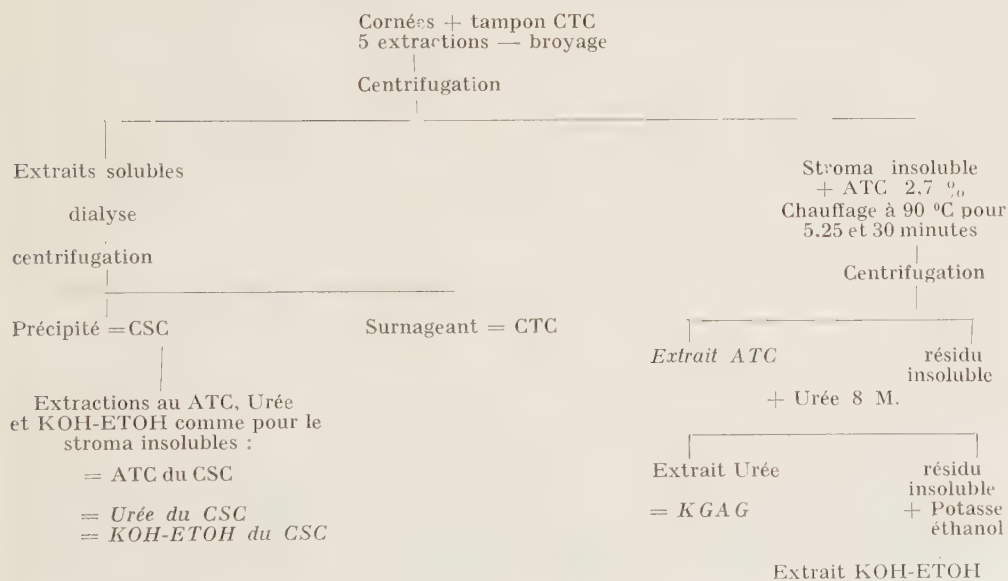
Cette même méthode peut être appliquée à tous les types de tissu conjonctif avec de légères modifications (L. ROBERT, J. PARLEBAS, N. POUILLAIN, 1963) (I. GOLDSTEIN, P. REBEYROTTE, J. PARLEBAS, B. HALPERN, 1968).

L'extrait qui a surtout retenu notre attention est celui obtenu avec l'urée. Les analyses ont révélé dans cet extrait une glycoprotéine. Tous les types de tissu conjonctif étudiés contiennent une fraction urée soluble analogue à celle obtenue à partir de la cornée. Nous proposons la dénomination « glycoprotéine de structure » pour désigner cette famille de glycoprotéines. Pour la glycoprotéine de structure de la cornée, nous l'avons nommée KERATOLYCOSAMINOGLYCANE ou KGAG.

La fraction de collagène soluble qui précipite pendant la dialyse (CSC) ne peut être solubilisée entièrement dans les solutions aqueuses diluées. Nous l'avons fractionnée en la soumettant à l'extraction par l'ATC à chaud, suivie de l'extraction à l'urée. Cette extraction « urée » de la fraction CSC contient une glycoprotéine semblable à celle du stroma insoluble.

TABLEAU I

EXTRACTION DE LA GLYCOPROTÉINE DE LA CORNÉE



B. FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION DE LA KGAG

Méthode

Séparation par chromatographie sur colonne. — Nous avons utilisé le DEAE-cellulose, comme absorbant et le Sephadex et Biogel de différentes porosités comme tamis moléculaire pour la chromatographie d'exclusion. Ces colonnes ont été préparées après les lavages habituels à l'acide chlorhydrique normal et à la soude normale et par le tampon d'élution.

La méthode d'élution sera indiquée dans la partie expérimentale. Les fractions ont été collectées sur un collecteur de fractions automatique Buchler, refroidi.

La distribution des protéines entre ces fractions est déterminée par le dosage des protéines selon la méthode de LOWRY ou par la mesure de l'absorption à 280 m μ .

MÉTHODES PHYSICO-CHIMIQUES

Les analyses biochimiques ont été effectuées sur la préparation purifiée de la KGAG selon les techniques devenues classiques dans l'étude biochimique du tissu conjonctif. A cela s'ajoutent les méthodes d'identification chromatographiques des sucres et des amino-acides.

Les dosages utilisés ont été les suivants :

— *Protéines : Biuret* (G. ALLAN, GORNALL, J. CHARLES, BARDAWIEL et M. DAVID, 1948). *Lowry* (O. H. ROSEBROUGH, FARR et R. J. RANDALL, 1951).

— *Azote : Kjeldahl* (d'après E. KABAT et M. MEYERS, 1961).

— *Hexoses et sucres totaux : Technique* de Z. DISCHE (1962) à l'acide sulfurique-cystéine. *Technique à l'Orcinol selon Montreuil* (J. TILLMANS, K. PHILIPPI modifié par RIMINGTON en 1940 et MONTREUIL en 1964). *Technique* de PARK-JOHNSON (1949).

— *Hexosamines : Technique* de ELSON et MORGAN (1933) au réactif d'ERLICH.

— *Acides uroniques : Technique* de Z. DISCHE (1947) au carbazol.

— *Acide sialique : Acide sialique total* (L. SVENNERHOLM, 1957). *Acide sialique libre* (D. AMINOFF, 1961).

— *Amino-acides : Hydroxyproline* (L. BERGMAN et R. LOXLEY, 1961). *Tryptophane* (F. ANDERSON et J. THOMAS, 1962). *Dosage automatique* selon la technique de STEIN et MOORE sur l'analyseur BECKMAN 120 B.

— *Sulfates : Méthode néphélométrique.*

Chromatographie de partage

La chromatographie des sucres a été faite après hydrolyse acide de l'échantillon étudié (HCl 2 N). La migration est obtenue sur papier Schleicher-Schüll n° 2043 B par la méthode descendante avec le mélange pyridine-acétate d'éthyle-eau (3-5-2 v.) (A. UNDERWOOD et ROCKLAND, 1954).

Composition en amino-acides

La composition en amino-acides a été étudiée qualitativement par la chromatographie de partage après hydrolyse acide de 24 heures (HCl 6 N).

La migration est obtenue sur papier Wathman n° 1 dans un solvant-N-butanol-acide acétique-eau (5-3-1 v.) et la révélation des taches faites avec la ninhydrine suivant la méthode de STEIN et MOORE (1954).

Le dosage quantitatif a été fait en collaboration avec M. Comte (au Centre Technique du Cuir à Lyon) sur un analyseur d'amino-acides (L. ROBERT et P. COMTE, 1968) (P. COMTE, J. PARLEBAS, L. ROBERT, 1967).

Spectre d'absorption

Les spectres sont obtenus en lisant l'échantillon sur un spectrophotomètre BECKMAN D U. entre 220 et 400 m μ .

Les préparations purifiées de KGAG par passage sur colonne de Biogel p-100 ont été soumises à des études par ultracentrifugation analytique et électrophorèse en veine liquide.

Ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique a été effectuée sur un appareil de Spinco au centre d'ultracentrifugation du C.N.R.S. (laboratoire de M^{me} WURMSER).

Électrophorèse sur Cellogel

Elle a été effectuée sur des bandes de Cellogel en tampon Véronal à pH 8 sous 70 v. pendant 60 minutes. La coloration des bandes est faite par l'amido-Schwartz.

RÉSULTATS

Séparation par chromatographie sur colonne

La figure 1 montre le diagramme d'élution d'une colonne de DEAE-SEPHADEX-A-25 chargée avec un extrait « Urée » de cornée de veau et éluée avec un tampon acétate d'ammoniaque 0,05 molaire pH 7 en urée 4 molaire. (L. ROBERT, J. PARLEBAS, 1967).

Un pic très important sort de la colonne avec le front du solvant, suivi de plusieurs petits pics retenus par le gel. Le 1^{er} pic (fractions n° 15 à 22) et le 2^e pic (fractions n° 23 à 35) ont été dialysés, lyophilisés et analysés séparément. La teneur en hexoses du 1^{er} pic est de 4 à 5 % et celle du 2^e pic est de 17 %.

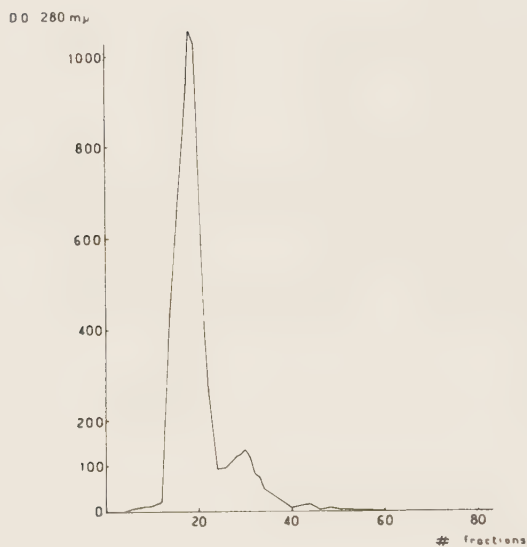


FIG. 1. — Diagramme d'élution de la KGAG de veau sur une colonne de DEAE-Sephadex A-25 avec urée 4 M à PH 7.

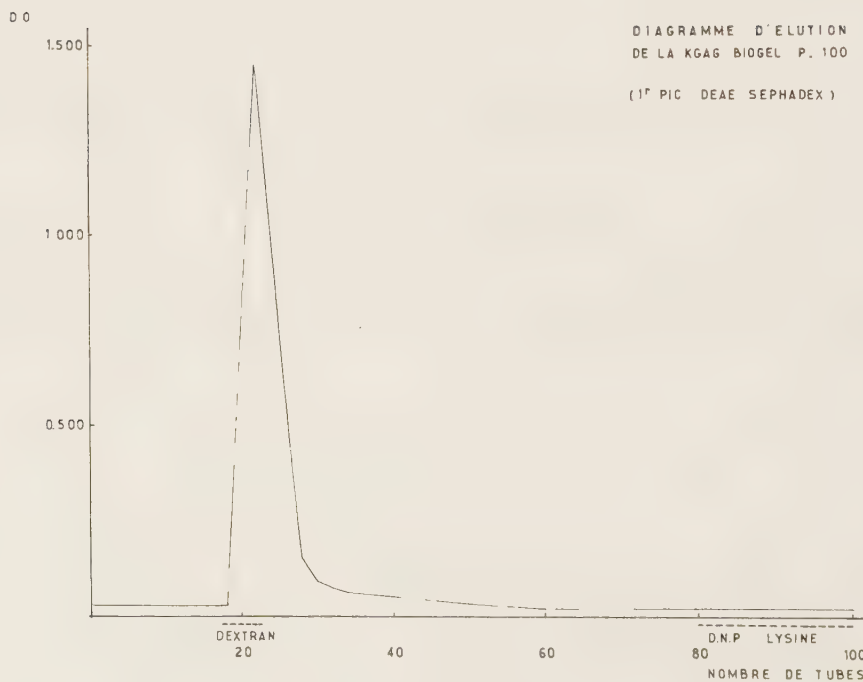


FIG. 2. — Diagramme d'élution de la KGAG de veau sur une colonne de Biogel P. 100 (1^{er} pic DEAE-Sephadex).

Le 1^{er} pic contient une glycoprotéine et les pics successifs contiennent probablement des glycopeptides. Ces glycopeptides peuvent être dûs éventuellement à la dégradation du stroma par l'acide trichloracétique. La grande majorité des glycopeptides peuvent être séparés par la précipitation de la glycoprotéine dans l'éthanol à concentration finale de 50 % à pH 7. Les glycopeptides restent dans le surnageant.

Le précipité peut être redissout dans l'eau et la figure 2 montre le diagramme d'élution d'une colonne de Biogel P-100 effectuée avec cette fraction. Nous pouvons voir que nous obtenons un pic homogène suivi encore d'une petite fraction retenue par le gel.

La glycoprotéine correspondant au pic (fractions n° 18 à 28) sort légèrement en arrière du front du bleu Dextran, ce qui laisse supposer qu'elle est légèrement retenue par le gel. Son poids moléculaire se situerait donc un peu en-dessous de 100 000.

Cependant il s'agit là d'une approximation grossière, car le volume d'élution du bleu dextran et de la DNP lysine a été déterminé dans un essai séparé. Notons aussi que le poids moléculaire apparent déterminé par gel filtration dépend du solvant employé. Toute une série d'observations portent à penser que cette glycoprotéine existe sous la forme de polymères à degrés de polymérisation variables.

Composition chimique de la KGAG

La glycoprotéine purifiée a été analysée en détails à l'aide des méthodes que nous venons de citer et le tableau n° 2 donne sa composition chimique :

TABLEAU II

PRÉPARATION P-65 III PURIFIÉE PAR PRÉCIPITATION A L'ÉTHANOL
ET PASSAGE SUR BIOGEL

Les résultats sont rapportés à 100 mg de poids sec (1)

Teneur en azote	14,02 % (2)
Protéines (Biuret)	88 % (3)
Hexoses (Orcinol)	6,9 %
Hexoses (Anthrone)	6,10 %
Hexoses (Dische)	5,5 %
Fucose (Dische)	0,42 %
Hexosamines (Elson-Morgan)	2,16 %
Sulfate (BaCl ₂)	0,94 %
Acide sialique	0,04 %

(1) Déterminé après 1 heure de dessiccation sous vide à 110 °C dans un pistolet d'Abderhalden.

(2) Corrigé pour la teneur en hexosamines.

(3) Déterminé par rapport à la sérumalbumine de bœuf,

La teneur en hexoses de cette préparation est de 5,5 % à 6,5 % suivant la méthode utilisée et le rapport Hexoses/Hexosamines est de 1/3 et contient près de 1 % de sulfates.

Des résultats semblables ont été obtenus en variant légèrement la méthode de préparation. Nous avons étudié par la même méthodologie plusieurs préparations : les variations constatées dans leur composition sont de l'ordre de plus ou moins 15 % et sont probablement dues à une contamination plus ou moins importante par les glycopeptides à forte teneur en hexoses. Ces glycopeptides isolés par précipitation éthanolique (surnageant de précipitation éthanolique à 50 %; voir préparation P-65 III purifiée) contiennent environ 17 % à 26 % d'hexoses et environ 1,4 % de fucose. La teneur en hexosamines par contre est plus faible (de l'ordre de 3,2 %). La présence en quantité variable de ces glycopeptides dans la préparation de KGAG pourrait donc expliquer la variation du rapport Hexoses/Hexosamines. Ce rapport en effet varie de 3,0 à 4,5 environ.

Composition de la copule glucidique

L'étude de la composition de la partie glucidique a été faite soit par chromatographie de partage sur papier (Erich HEFTMANN, 1961), soit par l'analyse des glycopeptides après digestion pronasique.

Par chromatographie de partage, la révélation des sucres faite avec le phtalate d'aniline nous a permis d'identifier quatre sucres : galactose, glucose, mannose, fucose.

Analyse des glycopeptides

Le tableau suivant emprunté au travail de E. MOCZAR et M. MOCZAR (1967) montre le résultat de l'analyse des glycopeptides après hydrolyse pronasique et passage sur colonne de Sephadex : (E. MOCZAR, M. MOCZAR, L. ROBERT, 1967); (E. MOCZAR, M. MOCZAR, G. SCHILLINGER, L. ROBERT, 1968).

TABLEAU III

	GLYCOPEPTIDES DE CORNÉE DE LAPIN	GLYCOPEPTIDES DE CORNÉE DE VEAU
Galactose	3	3
Glucose	1	1
Mannose	6	6,7
Hexosamines	5	6

Nous pouvons donc constater que d'après cette méthode, trois types d'hexoses sont mis en évidence : galactose — glucose — mannose — dans un rapport de 3 — 1 —

TABLEAU IV

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE LA KGAG

L'analyse d'amino-acides obtenue sur 3 préparations différentes de KGAG nous a donné les résultats suivants :

PREP.	VEAU	VEAU	LAPIN	LAPIN
	P-65-2 ₁	P-65-2 ₂	P-66-1	KOH-ETOH Extr.
ALLO-OH-Lys.. . . .	3,77	2,90	2,81	2,29
OH-Lys.. . . .	7,64	7,62	6,70	6,16
Lys.. . . .	44,25	44,99	47,03	47,17
His.. . . .	15,99	16,09	17,18	17,15
Arg.. . . .	59,80	54,23	48,72	56,38
3-OH-Pro.. . . .	±	0	11,84	0
4-OH-Pro.. . . .	±	0	±	18,75
Asp.. . . .	102,10	107,92	103,88	88,75
Threo.. . . .	50,89	50,45	49,77	27,84
Ser.. . . .	59,33	55,61	60,59	55,26
Pro.. . . .	56,68	61,05	58,74	60,43
Glut.. . . .	113,20	115,56	112,02	141,83
Glyc.. . . .	105,33	111,70	106,58	129,62
Ala.. . . .	70,13	72,17	73,86	85,86
Val.. . . .	86,32	84,84	79,70	65,72
Cys.. . . .	15,27	14,99	18,70	10,22
Meth.. . . .	10,89	5,46	9,38	2,23
I. leu.. . . .	46,91	49,46	47,57	47,69
Leu.. . . .	96,56	95,08	89,91	102,66
Tyr.. . . .	17,44	13,52	17,74	4,70
Phe. ala.. . . .	37,73	37,87	36,93	29,89
Total.. . . .	1 000,23	1 001,51	999,65	1 000,05
NH ₃	94,54	77,51	50,50	36,41

6. Le rapport Hexoses/Hexosamines est égal à 2 environ. Ceci montre que ces analyses ne sont valables que pour une partie de la copule glucidique de la KGAG. La partie non représentée dans ce tableau est probablement plus riche en hexoses et plus pauvre en hexosamines.

Il est intéressant de noter l'absence quasi totale d'hydroxyproline, ce qui permet déjà de distinguer cette préparation du collagène. Par contre on trouve régulièrement de l'hydroxylysine et l'allo-hydroxylysine en quantité relativement élevée. Notons encore la présence de cystéine et la richesse relative en amino-acides aromatiques de la préparation. Le tryptophane a été dosé par la méthode de ANDERSON dans certaines préparations, il représente environ 2 p. 100 de la partie protidique.

Toutes ces caractéristiques : teneur élevée en amino-acides aromatiques, présence de proline et pauvreté en hydroxyproline, permettent de distinguer nettement

la glycoprotéine de structure de la cornée des autres protéines du tissu conjonctif comme le collagène ou l'élastine.

Malgré la différence des préparations, on remarque une grande similitude dans la composition en amino-acides. Ceci suggère que le fractionnement et les purifications ne modifient guère leur composition. On remarque, de même, que la composition en amino-acides de la KGAG de veau est très proche de celle de la KGAG de lapin.

La plus faible teneur en thréonine-cystéine et tyrosine de l'extrait dans la potasse éthanolique peut être facilement expliquée par la dégradation rapide de ces amino-acides en milieu alcalin.

Caractéristiques bio-physiques

L'analyse spectrophotométrique en U.V. entre 220 et 400 m μ montre un maximum d'absorption à 280 m μ (fig. 3). Sur ce même graphique, nous voyons que les préparations de KGAG de lapin, de cheval ou de veau, ont des courbes analogues.

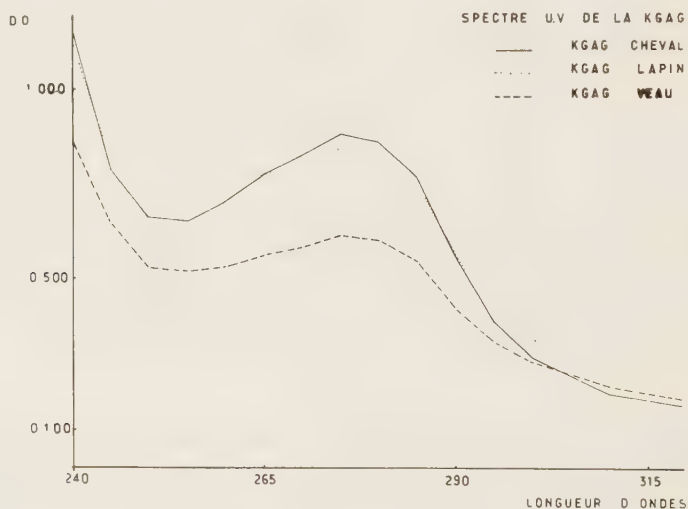


Fig. 3. — Spectre d'absorption de la KGAG (Cheval, Lapin, Veau).

Les ultracentrifugations analytiques

faites avec la préparation « P-65-III », ont révélé la présence de deux constituants au moins. Leur constante de sédimentation dépend du milieu dans lequel l'étude est faite et aussi du degré de purification de la préparation.

Le tableau V montre les coefficients de sédimentation calculés pour 20 °C.

TABLEAU V

PRÉPARATION	CONCENTRATION (mg/ml)	MILIEU	VITESSE DE RÉGIME (t/min.)	COEFFICIENT DE SÉDIMENTATION à 20 °C
P-65-III	2,6	Tris-Hcl 0,05 M. pH 7,5 — Urée 4 M.	50 740	1 ^{er} pic : 1,68 2 ^e pic : 2,31
P-65-III	2,6	id.	67 770	1 ^{er} pic : 1,74 2 ^e pic : 2,83
P-65-III purifiée	4	id.	59 780	1 ^{er} pic : 0,78 2 ^e pic : 3,03

Nous constatons qu'après purification, le 1^{er} pic sédimente plus lentement qu'avant purification, tandis que le 2^e pic garde à peu près la même mobilité. Il est toutefois possible que ces différences soient dues à une plus forte variation de la vitesse de sédimentation suivant la concentration. Comme la préparation s'est révélée hétérogène, nous n'avons pas cru utile de poursuivre ces études qui seront complétées après la séparation des deux fractions. Les figures 4 et 4 bis montrent le diagramme

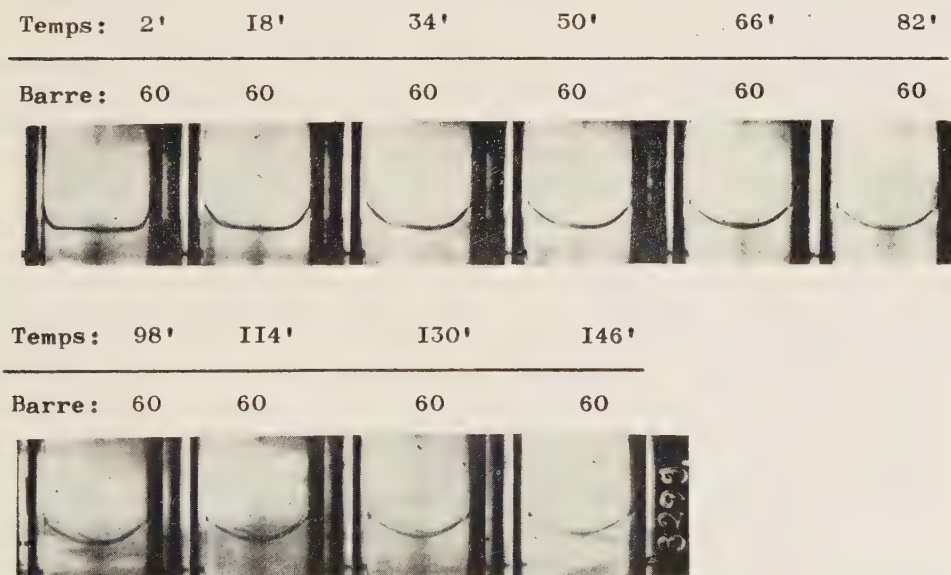


FIG. 4 et 4 bis. — Diagramme de sédimentation obtenu avec une préparation purifiée de KGAG de Veau.

de sédimentation obtenu avec la préparation purifiée. On peut noter la séparation rapide des 2 pics au cours de la sédimentation.

Les préparations de KGAG étudiées comportent probablement deux sortes de molécules, la taille de la première serait approximativement deux fois celle de la seconde.

La charge de ces deux subunités doit être différente aussi car, en milieu acide, elles ont des mobilités électrophorétiques différentes. En milieu alcalin, ces différences s'estompent, la préparation migre sous un seul pic hétérogène. Il est donc probable que ces différences de charge portent sur des fonctions basiques de la molécule.

Il n'est pas exclu qu'il s'agisse d'un monomère pouvant donner des protomères (dimères en particulier) avec un équilibre de polymérisation dépendant de la composition du milieu (pH, force ionique, concentration en urée).

Ces études devront être reprises et complétées après la modification de préparation permettant de réduire au minimum la dégradation de la molécule.

Électrophorèse sur Cellogel

L'électrophorèse sur cellogel montre une mobilité électrophorétique analogue à celle d'une α -2-globuline.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

L'étude physico-chimique que nous avons entreprise comporte en premier lieu une méthode d'extraction adéquate pour les complexes sucre-protéine qui caractérisent les glycoprotéines.

L'élimination successive des différents constituants avant tous les mucopolysaccharides acides et les protéines solubles à l'aide de tampon à grande force ionique et à base de chlorure de calcium suivi de l'élimination du collagène à l'aide d'une hydrolyse modérée par l'acide trichloracétique à 2,7 %, nous a permis d'aborder l'étude d'un autre composant insoluble : la KGAG, solubilisable seulement par l'Urée 8 Molaire. Cette méthode d'extraction permet d'éviter les inconvénients rencontrés au cours des hydrolyses drastiques et d'isoler notre substance avec le moins de dégradation possible. La glycoprotéine de structure ainsi isolée se caractérise par la présence d'une petite quantité d'hexoses et d'hexosamines (hexoses 6,9 % — hexosamines 2.16 %) une faible quantité d'acide sialique (0,04 %) et par l'absence des acides uroniques.

La composition en amino-acides est caractérisée par l'absence d'hydroxyproline, la présence de l'hydroxylysine et allohydroxylysine ainsi qu'une richesse relative en amino-acides aromatiques. Les acides aminés diacides ainsi que le glycolle forment la plus grande partie des résidus d'amino-acides.

Les caractéristiques bio-physiques nous montrent une substance apparemment homogène qui présente un certain degré de polydispersion avec une mobilité électrophorétique analogue à celle d'une α -2-globuline et un poids moléculaire d'environ 100 000.

II. ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE

SUMMARY

II. Immunological research

The results obtained with the help of different immunological technics, demonstrate the antigenic properties of KGAG.

Circulating antibodies, which can be measured by precipitation and haemagglutination, appear after injection of this glycoprotein into animals whilst antibody fixed to tissues has been demonstrated by immunofluorescence and corneal grafting.

Cross reactions have been observed between corneal glycoproteins of different animal species, as also between KGAG and other conjunctival glycoproteins. However, in spite of these cross reactions, the immunological specificity of KGAG is shown by sensitive technics such as corneal grafting.

*
* *

INTRODUCTION

Dans la première partie de notre étude, nous avons montré les résultats d'une technique originale pour l'isolement et la purification d'un composant glycoprotéique neutre de la cornée de mammifère lié aux structures insolubles (KGAG).

Dans la deuxième partie, nous envisageons de préciser l'antigénicité de cette substance, le degré des réactions croisées envers les KGAG extraites des cornées de différentes espèces, des réactions immunologiques croisées de la KGAG avec les autres constituants du tissu conjonctif, ainsi que son rôle éventuel dans l'immunité de greffe.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparations d'antisérums :

Les extraits suivants ont été utilisés comme antigènes :

- Stroma cornéen débarrassé des protéines solubles par extraction au CTC.
- Extrait CTC contenant les protéines et les mucopolysaccharides solubles de la cornée.
- Précipité CSC contenant le collagène soluble brut.
- Extrait ATC contenant la gélatine dérivée du collagène insoluble de la cornée.
- Extrait urée du stroma contenant la KGAG.

Les taux de protéines de ces extraits ont été évalués par la méthode de Biuret et pour l'injection aux animaux nous avons utilisé de 2 à 5 mg, de protéines par injection.

Animaux d'expérience

- *Lapins* des deux sexes de toutes les espèces, pesant de 2,5 kg à 3 kilogrammes.
- *Poules et coquelets* d'environ 2 kilogrammes achetés à l'élevage de l'Institut Pasteur.

Méthode d'immunisation

Pour avoir un meilleur rendement en anticorps nous avons ajouté aux antigènes utilisés de l'adjuvant complet de Freund (Difco) pour les injections intra-musculaires ou l'antigène précipité à l'alun d'ammonium pour les injections intra-veineuses.

— Les immunisations ont été faites en administrant 3 fois par semaine en injection intra-musculaire ou sous-cutanée, une émulsion de 1 millilitre d'extrait contenant de 2 à 5 milligrammes de protéines additionnées d'adjuvant, cela répété pendant quatre semaines consécutives.

La cinquième semaine l'animal ne reçoit aucune injection. La sixième semaine, qui est celle du rappel, l'animal reçoit 3 injections identiques à celles de la première semaine. Cinq jours après la dernière injection, nous testons le sérum par réaction de précipitation (ring-test). Si la réaction est positive, l'animal est saigné (cathétérisation de la carotide).

Les injections intra-veineuses ont été faites avec les mêmes quantités d'antigène, au même rythme et pour une durée identique.

RECHERCHE DES ANTICORPS PRÉCIPITANTS

a) DOUBLE DIFFUSION EN GÉLOSE SELON OUCHTERLONY (1958).

Effectuée dans des boîtes de Pétri, en utilisant une gélose à 0,8 p. 100 dans un tampon véronal.

b) RÉACTIONS DE PRÉCIPITATIONS EN TUBE (ring-test).

c) DOSAGE DES ANTICORPS PAR PRÉCIPITATION.

Nous avons utilisé la méthode de précipitation spécifique selon HEIDELBERGER (1935). Des quantités croissantes d'antigène sont mélangées avec des quantités constantes d'antisérum. Les tubes sont incubés 1 heure à 37 °C et quelques jours à + 4 °C.

Après centrifugation à 5 000 tours environ à froid, on lave 2 fois le précipité avec du chlorure de Sodium à 0,9 p. 100 refroidi à 0 °C. Le précipité est ensuite dissous dans 0,5 ml de Soude normale et l'on dose les protéines par la méthode de

Lowry. Pour certaines expériences nous avons utilisé une préparation de KGAG marquée à l'Iode 121. (B. (B. BÉNACÉRAFF, B. HALPERN, C. STIFFEL, S. CRUCHAUD et G. BIOZZI - 1955.)

RECHERCHE DES ANTICORPS HEMAGGLUTINANTS

Pour ce dosage nous avons utilisé la méthode antérieurement décrite (B. HALPERN, M. JACOB, R. BINAGHI, J. PARLEBAS - 1961).

L'antigène est couplé aux globules rouges de lapin à l'aide de la benzidine tétrazotée. En l'absence d'anticorps les hématies sédimentent normalement. Lorsque l'antigène entre en combinaison avec l'anticorps spécifique, il se produit un phénomène d'agglutination des globules.

Pour exprimer le titre en anticorps de l'antisérum, nous donnons l'inverse de la plus forte dilution ayant encore produit une agglutination distincte.

On prépare une dilution géométrique d'antisérum dans les godets d'une plaque en plastique et on ajoute quelques gouttes de globules rouges sensibilisés avec l'antigène. Des contrôles sont effectués avec des globules rouges non sensibilisés.

IMMUNOFLUORESCENCE

Cette méthode est utilisée pour la détection des antigènes tissulaires et pour déterminer les réactions antigène-anticorps au niveau des tissus. (A.H. COONS et M.H. KAPLAN - 1950.)

La préparation des coupes ainsi que la technique de fixation des anticorps anti-KGAG, ont été faites selon la méthode directe de COONS (1958).

Les gamma-globulines du sérum anti-KGAG ont été isolées par précipitation à froid au sulfate d'ammonium et marquées à l'isocyanate de fluorescéine.

Après conjugaison, les gamma-globulines sont chromatographiées sur Sephadex-G-50 afin d'éliminer toute fluorescence non liée.

Les gamma-globulines fluorescentes sont ensuite fractionnées sur colonne de DEAE-cellulose selon la technique de GOLDSTEIN et COLL. (1961), éluées dans un tampon phosphate 0,01 molaire à PH 7,5.

Nous avons utilisé cette méthode car elle permet de fractionner les gamma-globulines faiblement marquées par la fluorescéine. La fraction fortement marquée donne en effet souvent des réactions non spécifiques.

La concentration des gamma-globulines est de 0,3 à 2 mg/ml, à cette concentration on n'observe pas de fixation non spécifique.

Les coupes de cornées sont faites au cryostat, fixées dans l'éthanol à 96 p. 100 pendant 20 minutes, lavées 3 fois à l'eau physiologique tamponnée et recouvertes pendant 30 minutes avec l'antisérum fluorescent à tester (dans notre cas il s'agit du sérum anti-KGAG).

Après de nouveaux lavages, afin d'éliminer les protéines non fixées sur l'antigène, les coupes sont montées entre lame et lamelle en glycérine tamponnée.

Les témoins utilisés ont été :

1° Sérum de lapin anti-ovalbumine, afin de détecter la fixation non spécifique des gamma-globulines sur les coupes.

2° De la sérum-albumine de bœuf fluorescente directement appliquée sur les coupes.

3° Un antisérum à étudier adsorbé sur de la KGAG ou du CSC.

IMMUNITÉ DE GREFFE

Pour la greffe de cornée, nous avons utilisé la méthode interlamellaire mise au point par PAYRAU et POULIQUEN (*) (L. ROBERT, P. PAYRAU, Y. POULIQUEN, J. PARLEBAS et B. ROBERT - 1965).

Des greffons de 4 à 5 millimètres de diamètre sont découpés avec une tréphine sur des cornées de lapin ou de veau fraîchement prélevées. Les animaux anesthésiés, on pratique une incision dans le cadran supérieur de la cornée et on glisse le greffon dans une poche préparée dans le stroma cornéen. (P. PAYRAU, Y. POULIQUEN et J.-P. FAURE - 1961.)

Ces greffes ont été faites sur des lapins sensibilisés suivant la technique déjà décrite et sur des lapins non traités ou ayant simplement reçu soit des injections de chlorure de Sodium à 0,9 p. 100, soit des adjuvants incomplets de Freund.

Le taux d'anticorps circulants déterminé par la méthode d'hémagglutination passive a été suivi régulièrement chez ces animaux et les greffes ont été effectuées quand le taux d'anticorps a été considéré comme suffisamment élevé.

A ce moment on applique sur l'œil gauche une homogreffe (cornée de lapin) et sur l'œil droit une hétérogreffe (cornée de veau ou de porc). Les animaux opérés sont journellement suivis par observation de la réaction d'intolérance qui se manifeste par œdème du stroma cornéen, apparition d'une vascularisation, opacification du greffon et éventuellement de la cornée réceptrice.

RÉSULTATS

Recherche des anticorps précipitants

L'injection d'antigène du tissu conjonctif de la cornée montre que ce tissu a de réelles propriétés antigéniques. Les analyses ont été faites avec des sérums de Poule et de Lapin injectés avec des extraits conjonctifs de cornées de Veau, de Cheval ou de Lapin.

Les problèmes posés sont les suivants :

— Quels sont les extraits présentant une antigénicité et la relation existant entre cette antigénicité et la nature biochimique de ces extraits ?

(*) Nous remercions particulièrement le Pr PAYRAU et le Pr POULIQUEN, qui ont pratiqué ces greffes chez nos animaux.

— Existe-t-il une spécificité d'organe pour la KGAG?

— Existe-t-il une spécificité d'espèce pour la KGAG?

1° Pour répondre à la première question nous avons immunisé des lapins avec des extraits cornéens de Veau et nous avons testé ces immunosérums par double diffusion en gélose contre les extraits solubles de cornées de Veau.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VI (B. ROBERT, J. PARLEBAS et L. ROBERT - 1963).

TABLEAU VI
DOUBLE DIFFUSION EN GÉLOSE (OUCHTERLONY)

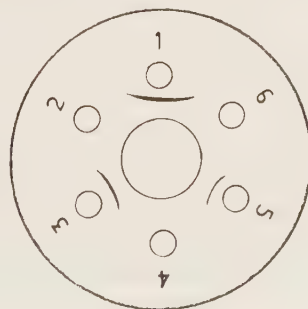
IMMUNOSÉRUMS	ANTIGÈNES EXTRAITS DES CORNÉES DE VEAU		
	CTC	KGAG	CSC (extrait urée)
Lapin anti-CTC de cornée de Veau. . .	3 lignes	1 ligne	1 ligne
Lapin anti-CSC de cornée de Veau . .	1 ligne	1 ligne	1 ligne
Lapin anti-stroma post-CTC de cornée de Veau	±	0	0
Lapin anti-extrait ATC de cornée de Veau	0	0	0
Lapin anti-KGAG de Veau	1 ligne	1 ligne	±

Les résultats contenus dans ce tableau montrent que des anticorps hétérologues peuvent être obtenus facilement contre certains de ces extraits. On doit souligner l'antigénicité prononcée des protéines solubles ainsi que celle de la KGAG.

Par contre l'extrait ATC semble dépourvu d'antigénicité.

FIG. 5. — Immuno-diffusion en gélose, au milieu un immun sérum de Poule anti-KGAG de Cheval.

- 1 : KGAG de Cheval.
- 2 : KGAG de Bœuf.
- 3 : KGAG de Porc.
- 4 : Gélatine purifiée de la cornée de Cheval (ATC).
- 5 : KGAG de Lapin (1 mg/ml).
- 6 : KGAG de Lapin (0,5 mg/ml).



Si l'on considère que l'une des lignes de précipitation obtenue contre le CTC est due à la KGAG, on peut supposer que toutes les formes de KGAG sont antigéniques : la forme soluble qui se trouve dans l'extrait CTC, la forme liée au collagène dans l'extrait CSC ainsi que la KGAG (extrait urée) (fig. 5).

2° Notre seconde question concerne la spécificité d'organe de ces antigènes.

Pour y répondre nous avons testé les immunosérums de lapins anti-extraits de cornée de Veau avec différents extraits conjonctifs de cornées de Veau, ainsi que de valvules cardiaques, aorte, synoviale de Veau (même type d'extraction).

Nous avons également testé des sérums de lapins immunisés avec des valvules et des synoviales de Veau contre les extraits cornéens de Veau.

Les résultats sont mentionnés dans les tableaux VII et VIII.

TABLEAU VII
DOUBLE DIFFUSION EN GÉLOSE

IMMUNSÉRUMS	ANTIGÈNES				
	CTC-VB.	(*) Extrait urée-VB	(**) CTC Syn. V	Extrait urée- Syn. V	Extrait urée-aorte de Bœuf
Lapins anti-CTC cornée de Veau.	1 ligne	1 ligne	1 ligne	0	0
Lapins anti-KGAG de Veau.	1 ligne	1 ligne	0	0	0

(*) VB : Valvules de Bœuf.

(**) Syn. V : Synoviales de Veau.

TABLEAU VIII
DOUBLE DIFFUSION EN GÉLOSE

IMMUNSÉRUMS (*)	ANTIGÈNES			
	CTC cornées	KGAG	CSC cornées	CSC (extrait urée) cornées
	Lapins	Lapin	Lapins	Lapins
Lapin anti-CTC valvules de Bœuf .	1 ligne	1 ligne	0	0
Lapin anti-CTC synoviale de Bœuf.	1 ligne	0	0	0

(*) Nous remercions M. le Docteur I. GOLDSTEIN qui a mis à notre disposition ces immunosérums.

Les résultats mentionnés dans les tableaux VII et VIII démontrent qu'il existe à l'intérieur de la même espèce, des réactions croisées entre les différents extraits de tissus conjonctifs.

Ces réactions croisées sont basées sur les motifs antigéniques communs existant entre les protéines solubles de la même espèce.

La parenté immunologique est d'autant plus grande que tous ces extraits ont pour origine le tissu conjonctif et sont préparés avec une méthode d'extraction identique.

3° *Notre troisième question concerne le degré de spécificité d'espèce.* Pour analyser cette question, nous avons testé des immunsérums de Lapin et de Poule immunisés avec des extraits de cornées de Veau, de Cheval et de Lapin.

Ces résultats sont donnés dans le tableau IX, ils nous démontrent donc l'existence de motifs antigéniques communs entre les extraits cornéens des différentes espèces.

Pour apprécier le degré de ces réactions croisées, nous avons fait des précipitations en tubes (ring-tests). Ces résultats sont donnés dans le tableau X.

TABLEAU IX
DOUBLE DIFFUSION EN GÉLOSE

IMMUSÉRUMS	CTC CORNÉE VEAU	KGAG VEAU	CTC CORNÉE CHEVAL	KGAG CHEVAL	CTC CORNÉE LAPIN	KGAG LAPIN
Lapin anti-CTC cornées de Veau	1 ligne	1 ligne	1 ligne	1 ligne	0	0
Lapin anti-KGAG de Veau.	1 ligne	1 ligne	1 ligne	1 ligne	0	0
Poule anti-CTC cornées de Lapin	1 ligne	1 ligne	1 ligne	1 ligne	3 lignes	1 ligne
Poule anti-KGAG de Lapin	1 ligne	1 ligne	1 ligne	1 ligne	1 ligne	1 ligne

Les résultats du tableau X nous montrent l'existence de réactions croisées entre les différentes KGAG : Veau ou Bœuf, Cheval et Lapin, variables selon l'origine des anticorps. Ces réactions croisées ne démontrent pas l'identité des extraits, ce qui permet de conclure qu'il existe seulement des motifs antigéniques communs.

Ces résultats ont été confirmés par les réactions d'héماغglutination passive (voir chapitre correspondant).

TABLEAU X
RECHERCHE DES RÉACTIONS CROISÉES

IMMUNoSÉRUMS		KGAG CHEVAL	KGAG BŒUF	KGAG LAPIN
Lapins	Anti-KGAG Cheval	+++	±	0
	Anti-CSC C. Cheval	+++	0	0
	Anti-ATC C. Cheval	0	0	0
Poules	Anti-KGAG Cheval	+++	0	++
	Anti-CSC C. Cheval	+	0	0
	Anti-ATC C. Cheval	0	0	0
Lapins	Anti-KGAG Veau	+++	+++	0
Poules	Anti-KGAG Veau	+++	+++	+++
Poules	Anti-CSC C. Lapin	+	+	+

Dosage d'anticorps précipitants

La fréquence et l'importance des précipitations par double diffusion en gélose et par précipitation en tube (ring-test), nous a incité à faire des courbes de précipitation par dosage des anticorps précipitants, selon la méthode décrite au début de ce chapitre.

Nous présentons comme référence un sérum de lapin anti-KGAG de Cheval en employant comme antigène la KGAG de Cheval.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 6.

On peut ainsi voir que les immunosérums de lapin anti-KGAG de Cheval contiennent une quantité appréciable d'anticorps précipitants, environ 350 μ /gr globulines anticorps par millilitre de sérum.

Recherche des anticorps hémagglutinants

Les résultats obtenus par la technique d'hémagglutination passive sont donnés dans le tableau XI.

D'après les résultats indiqués dans le tableau XI nous remarquons que les taux d'hémagglutination chez les lapins immunisés avec des extraits de cornée de Lapin ne produisent pas d'anticorps décelables par cette méthode.

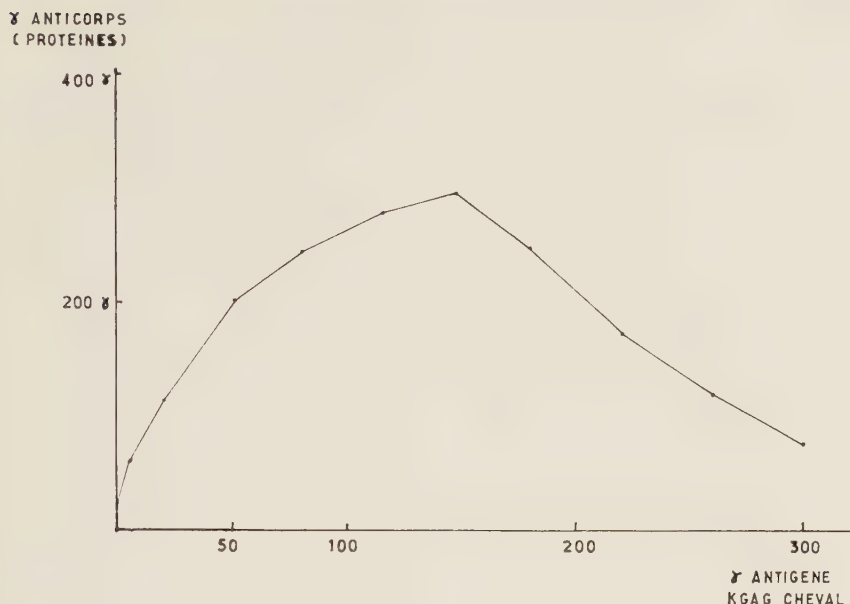


FIG. 6. — Courbe de précipitation d'un immunosérum anti-KGAG de Cheval.

Par contre le taux d'anticorps obtenu avec les antigènes de Veau ou de Cheval, augmente. Cette observation suggère un mécanisme de sélection des sites hétérospécifiques sur une molécule reconnue par des cellules fabriquant des anticorps.

Les lapins immunisés avec le stroma de cornée de Veau, donnent des réactions croisées très faibles avec la KGAG de Cheval et de Lapin.

Les lapins immunisés avec le CSC de cornée de Cheval donnent des réactions croisées plus importantes avec la KGAG de Veau.

Les lapins immunisés avec la KGAG de Cheval donnent des taux d'hémagglutination relativement élevés avec la KGAG de Cheval et de Veau mais un taux presque négatif avec la KGAG de Lapin. Nous pouvons remarquer dans ce tableau que les réactions croisées avec la KGAG de Lapin sont toujours très faibles.

Les antisérums de Poule ont donné des taux d'hémagglutination intéressants, ils sont plus élevés que pour les antisérums de Lapin, avec des réactions croisées plus importantes et plus nettes.

Soulignons que l'antisérum de Poules immunisées avec des extraits de stroma de cornée de Lapin, réagit très fortement avec la KGAG de Veau et de Lapin mais plus faiblement avec la KGAG de Cheval.

Les mêmes résultats sont obtenus avec les antisérums de poules immunisées avec l'extrait CSC de cornée de Lapins, par contre les Poules immunisées avec l'extrait CSC de cornée de Cheval ont donné un anti-sérum dont les taux d'hémagglutination sont identiques avec les trois KGAG.

Les antisérums de poules immunisées avec les KGAG de Veau et de Cheval réagissent bien avec les trois KGAG.

TABLEAU XI
ANTICORPS HÉMAGGLUTINANTS

ANIMAUX IMMUNISÉS	ANTIGÈNE INJECTÉ	TAUX D'HÉMAGGLUTINATION (*) Antigènes testés		
		KGAG Veau	KGAG Cheval	KGAG Lapin
6 lapins	Stroma cornée Lapin	630	630	30
6 lapins	CSC cornée Veau	10 240	60	30
6 lapins	Stroma cornée Veau	1 024	30	30
6 lapins	CSC cornée Cheval	512	1 024	30
6 lapins	KGAG Cheval	256	256	30
3 poules	CSC cornée Lapin	512	256	512
3 poules	CSC cornée Lapin	512	60	128
3 poules	Stroma cornée Lapin	1 920	160	1 920
3 poules	Stroma cornée Lapin	620	80	960
3 poules	KGAG Veau	3 840	640	640
3 poules	KGAG Veau	1 920	320	160
3 poules	CSC cornée Cheval	960	960	960
3 poules	KGAG Cheval	960	960	960
3 poules	KGAG Cheval	1 920	1 920	1 920

(*) Les nombres indiquent la dilution la plus forte de l'immunsérum donnant encore une hémagglutination nette.

L'interprétation de nos résultats montre que la technique d'hémagglutination passive que nous avons employée paraît bien indiquée pour l'étude de l'antigénicité des extraits conjonctifs en général et surtout de la KGAG.

Cette méthode paraît un peu moins sensible que celle utilisée pour la précipitation en gel.

Cela pourrait être dû soit à un élément d'ordre technique, concernant la fixation de l'antigène sur les hématies, soit peut-être à l'existence d'anticorps différents de ceux des anticorps précipitants.

Comme nous l'avons constaté par la technique de précipitation, l'hémagglutination met en évidence les mêmes réactions croisées envers les KGAG de différentes espèces.

De tous les sérums utilisés, ceux des poules paraissent les plus riches en anticorps. Les taux obtenus avec les différents extraits sont plus élevés que ceux obtenus avec des immunosérums de Lapins, ce qui fait supposer que cette espèce est mieux adaptée à l'étude de l'antigénicité des extraits conjonctifs. La qualité des gamma-globulines anticorps en est probablement la cause.

En ce qui concerne l'antigène immunisant, on constate que l'injection de stroma cornéen ou de CSC de cornée provoque également l'apparition d'anticorps anti-KGAG. Ceci est en faveur de l'hypothèse déjà énoncée, selon laquelle des glycoprotéines similaires ou identiques restent liées aux protéines fibreuses du CSC et du stroma cornéen.

Immunofluorescence

Les gamma-globulines fluorescentes d'un immunosérum anti-KGAG de veau se fixent sélectivement au niveau du stroma cornéen, sans réagir avec l'épithélium.

Les cornées de Veau, de Cheval et de Souris prennent ces anticorps à peu près avec la même intensité.

La figure 7 montre une cornée de Souris avec les travées fibreuses du stroma, rendues uniformément fluorescentes par la préparation d'anticorps anti-KGAG de

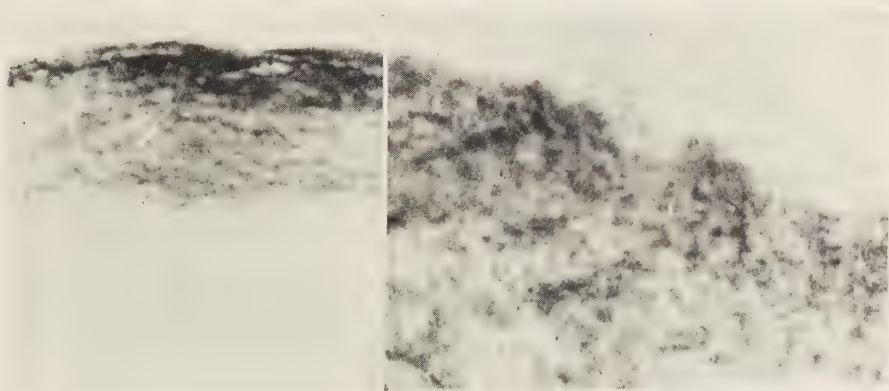


FIG. 7. — Immunofluorescence d'un antisérum anti-KGAG de Veau.
A droite : avec la cornée de Cheval.
A gauche : avec la cornée de Souris.
L'épithélium est vers le haut.

veau. Ces expériences montrent que la spécificité d'espèce ne se manifeste pas d'une façon décelable par l'immunofluorescence. (L. ROBERT, P. OUDEA, A. ZWEIBAUM, J. PARLEBAS, B. ROBERT, 1964-1965.)

En étudiant systématiquement les différents organes de Veau, nous avons pu déceler de fines fibres réagissant avec l'antisérum de Lapin anti-KGAG de Veau au niveau du derme surtout autour des follicules pileux, dans la sclérotique et dans les espaces portes du foie.

Ces études tendent à montrer que des substances ayant une nature immuno-chimique semblable ou voisine existent dans de nombreuses structures du mésenchyme.

A la suite de ces études, nous avons en effet réussi à extraire de nombreux organes, des glycoprotéines de structure liés à la trame fibreuse insoluble en utilisant une méthode analogue à celle permettant d'isoler la KGAG.

Ces constatations semblent confirmer les résultats obtenus par la technique de précipitation ainsi que par la réaction d'hémagglutination.

IMMUNITÉ DE GREFFE

Les résultats de ces expériences sont exprimés sous forme de tableaux sur lesquels le petit cercle représente le greffon, le grand cercle, la cornée réceptrice, les lignes brisées, l'intensité de la réaction vasculaire et les hachures du petit cercle, l'intensité de la réaction d'opacification.

LAPINS	SEMAINES APRES LA GREFFE			
	1	2	3	4
	D G	D G	D G	D G
NON TRAITES				
NON TRAITES				
EAU SALINE				
EAU SALINE				
ADJUVANT				
ADJUVANT				
ADJUVANT				
ADJUVANT				

FIG. 8. — Immunité de greffe; expérience de contrôle.

Sur la figure 8, nous voyons le résultat des expériences de contrôle, c'est-à-dire les animaux traités avec l'adjuvant seul ou le chlorure de Sodium à 0,9 p. 100 et nous remarquons qu'il y a très peu de réactions pendant les cinq premières semaines.

La figure 9 résume les résultats obtenus chez des Lapins immunisés avec la KGAG purifiée de Porc. Les chiffres indiquent en parallèle le taux d'anticorps dans le sang de ces Lapins au moment de la greffe.

		SEMAINES APRES LA GREFFE			
		1	2	3	4
CONTROLE	D	 inf. 1/2			
	G				
CONTROLE	D	 1/2			
	G				 R
CONTROLE	D	 1/2			
	G				
KGAG PORC	D	 1/2800			
	G	 1/2800	 < $\frac{1}{100}$	 R	
KGAG PORC	D	 1/2800			
	G	 1/2800	 < $\frac{1}{100}$	 R	
KGAG PORC	D	 1/2800			
	G	 1/2800	 < $\frac{1}{100}$	 R	

FIG. 9. — Immunité de greffe. Résultats obtenus avec des lapins immunisés avec la KGAG de Porc.

Nous pouvons remarquer chez des Lapins immunisés avec la KGAG de Porc des réactions très violentes avec à peu près 100 p. 100 de rejets ou d'opacifications. Par contre chez les lapins témoins, le taux d'hémagglutination est pratiquement nul dans la plupart des cas, les greffes sont tolérées sans opacification : la greffe retrouve sa transparence en quelques semaines et devient invisible.

Les photos de la figure 10 représentent les résultats d'hétérogreffes de cornée de Porc sur un animal témoin et sur un animal sensibilisé.



FIG. 10. — Hétérogreffes de cornée de Porc :

En haut : sur un lapin non immunisé.

En bas : sur un lapin immunisé avec la KGAG de Porc.

La figure 11 est l'examen histologique d'une cornée opacifiée obtenue chez un animal sensibilisé dont la réaction est typiquement celle que l'on voit dans un rejet de greffe.

Homo-et hétérogreffes chez des lapins sensibilisés par immunisation allogénique

Pour étudier le phénomène d'immunisation allogénique nous avons immunisé des lapins avec des extraits de cornée de Lapin et testé le sang de ces animaux par hémagglutination passive pour en contrôler le taux d'anticorps.

Les résultats ont montré que les lapins immunisés avec la KGAG de Lapin ne donnaient pas de taux significatif d'anticorps anti-KGAG de Lapin, par contre en titrant le sérum avec la KGAG de Veau nous avons obtenu des titres d'hémagglutination assez élevés.

Dans tous les cas les homogreffes ont été un peu moins bien tolérées que chez les animaux non immunisés : on a eu de petites opacifications mais pas définitives.



FIG. 11. — Coupe histologique d'une greffe de cornée.

Par contre les hétérogreffes ont été opacifiées à peu près aussi souvent que chez les animaux immunisés avec la KGAG de Veau.

Il semble donc que l'animal puisse produire des anticorps hétérologues tout en étant immunisé avec un produit homologue.

Pour expliquer ce phénomène, déjà constaté avec d'autres antigènes, on peut admettre que l'animal produit des anticorps homologues, mais ils sont vite fixés par ses propres tissus. Seuls resteraient dans le sang circulant les anticorps qui ont une spécificité plus marquée vis à vis des antigènes hétérologues, donnant ainsi des réactions croisées avec d'autres glycoprotéines.

Ce phénomène laisse supposer qu'il existe des motifs biochimiques communs entre les KGAG des différentes espèces et des motifs antigéniques beaucoup plus spécifiques pour chaque KGAG.

Ce sont ces motifs antigéniques qui pourraient être à la base de la « reconnaissance ou non » des tissus, dans l'immunologie des greffes.

On peut ainsi penser que l'organisme peut produire des anticorps ayant plus d'affinités pour des déterminants antigéniques hétérologues que pour des déterminants homologues, les deux étant présents dans la même molécule.

A partir de ces expériences, nous pouvons conclure à l'importance des glycoprotéines de structure en tant qu'antigène spécifique d'espèce tout au moins dans le domaine des greffes et permettant de reconnaître, chez l'animal, les tissus conjonctifs hétérologues. Ces expériences permettent de supposer que le mécanisme d'opacification des greffons est consécutif à la réaction immunologique.

Il ressort des résultats indiqués ici que des anticorps humoraux anticornés sont susceptibles de précipiter un processus de rejet.

Ce résultat semble *a priori* diverger des résultats d'ensemble obtenus dans les cas de rejet des autres tissus y compris la peau, où le rôle des autres anticorps humoraux reste encore douteux. Bien plus il existe des circonstances où les anticorps humoraux exercent au contraire un effet de protection. On a désigné ce type d'anticorps sous le nom d'anticorps facilitants (enhancement phenomenon, Kaliss 1958).

Dans les rejets de greffe ce sont les cellules lymphoïdes qui sont responsables de la reconnaissance des caractères étrangers de la greffe et qui en provoquent la destruction. Il est douteux que les processus soient différents dans le cas de la greffe cornéenne. Toutefois il n'est pas exclu, étant donné la nature avasculaire de la greffe de cornée, que des anticorps humoraux manifestent ici une action qui n'est pas admise classiquement dans le cas des greffons vascularisés.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

En résumé, les résultats obtenus par les différentes techniques immunologiques démontrent que la KGAG possède une antigénicité certaine.

L'injection chez l'animal de cette glycoprotéine est suivie d'apparition d'anticorps circulants dosés par les techniques de précipitation et d'hémagglutination.

Les anticorps liés aux tissus ont été mis en évidence par les techniques d'immunofluorescence et des greffes cornéennes.

Nous avons en même temps constaté un certain degré de réactions immunologiques croisées envers les glycoprotéines cornéennes de différentes espèces et aussi entre la KGAG et les glycoprotéines d'autres tissus conjonctifs.

Malgré ces réactions croisées, les techniques très sensibles comme les greffes démontrent la spécificité immunologique de la KGAG.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'observation des résultats obtenus, nous permet de considérer que la KGAG extraite par la méthode décrite dans ce travail, présente des caractères physico-chimiques et immunologiques particuliers.

L'analyse approfondie de ces résultats soulève un certain nombre de problèmes dont les solutions nécessitent bien entendu une suite à ce travail.

I. — Choix de la méthode d'extraction

Les méthodes utilisées pour les extractions des différents composants du tissu conjonctif ont été nombreuses.

La plupart des extractions aboutissent à des composants qui ne sont pas purs, ceci est dû le plus souvent à une solubilisation incomplète des constituants de ce tissu.

Les résultats biochimiques obtenus varient suivant ces méthodes. Nous pouvons citer par exemple un travail de DISCHE (1958) qui, tout en utilisant pour l'extraction un tampon de force ionique élevée et une hydrolyse trichloracétique ménagée, isole la glycoprotéine insoluble à l'aide de la potasse à concentration finale de 5 p. 100. Le produit obtenu contient 50 p. 100 de carbohydrates et 50 p. 100 de protéines. D'autres auteurs ont utilisé l'hydrolyse acide (G.M. HERRING - 1963) ou l'hydrolyse alcaline soit avec la soude comme BARNES (1964) soit avec l'hydroxylamine comme STEVEN (1966) ou encore utilisent des enzymes pour la solubilisation du collagène (GALLOP, SEIFTER et MEILMAN - 1957).

Toutes ces méthodes mettent en liberté des molécules plus ou moins dénaturées, riches en amino-acides caractéristiques du collagène et dans lesquelles les proportions protéines-sucres sont très variables.

Nous rappelons que dans notre travail nous avons dû étudier la concentration de l'acide trichloracétique à utiliser afin de choisir la concentration optimale qui d'un côté libère le collagène et de l'autre ne dénature pas le résidu insoluble.

La méthode d'extraction que nous avons utilisée est celle de DISCHE modifiée par ROBERT et décrite dans le texte. Elle présentait pour nous les avantages suivants :

a) Permettre l'extraction par étapes successives de tous les composants du tissu conjonctif de la cornée afin d'étudier ensuite la composition biochimique de chacune des substances isolées.

b) Les composés extraits ne sont pas des complexes des différentes fractions, mais des substances bien individualisées. Le résultat de notre travail a été de pouvoir extraire à partir du stroma insoluble de la cornée, une nouvelle glycoprotéine que les méthodes précédemment décrites n'arrivaient pas à solubiliser ou bien, trop brutales, détruisaient.

c) Cette méthode nous a permis d'isoler à partir de différents tissus conjonctifs (scélérétique, aorte, tendon, valvules cardiaques, etc.) des glycoprotéines qui ont approximativement la même composition biochimique que la KGAG.

II. — *Caractéristiques physico-chimiques de la KGAG*

Les données biochimiques présentées nous démontrent que la KGAG purifiée par passage sur Biogel présente une composition biochimique différente de celle des autres extraits : nous pouvons ainsi noter l'absence d'acides uroniques ce qui permet de la différencier des mucopolysaccharides acides, sa composition caractéristique en amino-acides, en particulier l'absence quasi totale d'hydroxyproline, qui permet de la distinguer du collagène, sa composition en sucres ; tous ces arguments sont en faveur de l'existence de la KGAG et de son individualité.

Bien que ses caractéristiques biochimiques nous montrent une substance homogène, ses propriétés physico-chimiques nous révèlent au moins deux composants

qui peuvent être soit deux substances différentes, soit deux états physico-chimiques de polymérisation d'une même substance. Ce phénomène a été décrit par GIBBONS (1966) comme étant une polydispersion de la plupart des glycoprotéines : les molécules possèdent la même composition biochimique mais varient par leur poids moléculaire, leur charge électrique et certains détails de structure.

III. — *Relations entre la composition biochimique du tissu conjonctif, sa morphologie et sa fonction*

Nous admettons que la quantité ou la qualité des quatre types de molécules (collagène, élastine, mucopolysaccharides acides, glycoprotéines de structure), déterminent la microarchitecture de la trame fibreuse conjonctive. Les principaux paramètres qui caractérisent cette microarchitecture sont les suivants :

- a) La teneur en fibres de collagène.
- b) Le rapport collagène/élastine.
- c) Le rapport mucopolysaccharides acides/collagène.
- d) La nature des mucopolysaccharides acides.
- e) Le rapport glycoprotéines de structure/collagène.

Les facteurs c), d) et e) doivent avoir une grande influence sur la façon dont les fibres de collagène sont déposées. Ces fibres peuvent former des faisceaux épais et parallèles comme dans le tendon par exemple, ou encore des faisceaux d'un diamètre très uniforme et très régulier qui sont disposés selon un ordre très particulier, comme dans la cornée.

Les fibres de collagène sont certainement les composants les plus constants de la trame conjonctive des animaux supérieurs. Le mécanisme de leur biosynthèse et de leur agrégation, sous forme de fibrilles et de fibres, est encore inconnu.

Suivant l'hypothèse que nous proposons pour la cornée, les fibroblastes sécrèteraient le tropo-collagène et la pro-KGAG simultanément et dans un rapport bien déterminé. Ces deux constituants s'associeraient ensuite au cours de la formation des fibres et la micromorphologie des faisceaux serait justement déterminée par la quantité relative de ces deux constituants. D'après ces données nous proposons les hypothèses suivantes.

1. La présence de glycoprotéine (Type KGAG) dans tous les tissus conjonctifs.
2. Le rapport collagène/glycoprotéine de structure qui varie d'un type de tissu à l'autre.
3. La corrélation fonctionnelle qui existe entre le collagène et les glycoprotéines de structure dans la fibrillogenèse conjonctive.

Pour appuyer ces hypothèses nous mentionnons les faits suivants :

— A l'aide d'un immunsérum de cornée de veau, nous avons réussi à mettre en évidence des glycoprotéines de structure dans tous les tissus examinés.

— Par l'immunofluorescence nous avons coloré des faisceaux de collagène plus fort que d'autres et nous avons pu apprécier ainsi la richesse du tissu en glycoprotéine de structure, ceci en concordance avec les résultats des dosages directs effectués dans ces glycoprotéines tissulaires.

— Par l'incorporation dans ces tissus d'acides aminés marqués au ^{14}C , l'activité spécifique des différentes fractions ainsi que la quantité totale d'isotopes incorporés sont en bon accord avec l'hypothèse proposée.

La quantité de glycoprotéine incorporée pourrait ainsi influencer la qualité et l'épaisseur des fibres et la densité des liaisons interchaînes, c'est-à-dire le degré de réticulation du collagène insoluble.

Cette propriété semble primordiale dans la formation des couches de collagène transparentes dans la cornée ou dans l'élaboration de la structure dense et très résistante des faisceaux de collagène du tendon.

IV. — *Problème de l'antigénicité de la KGAG*

Les essais immunologiques que nous avons faits, nous ont démontré la grande antigénicité de la glycoprotéine.

Ces glycoprotéines sont antigéniques dans toutes leurs formes, soit dans leur état soluble (CTC), soit liée au collagène insoluble (CSC), soit liée au stroma insoluble (glycoprotéine de structure).

Ce qui caractérise ces glycoprotéines c'est l'existence de réactions croisées entre les glycoprotéines extraites d'autres tissus conjonctifs de la même espèce ou fait encore plus surprenant, de réactions croisées avec des glycoprotéines de tissus conjonctifs d'espèces différentes (KGAG de Cheval, KGAG de Veau, etc.).

Ce phénomène immunologique laisse supposer l'existence de motifs biochimiques communs dans la molécule de glycoprotéine de différentes origines. L'étude immunologique ne peut pas à elle seule résoudre ces problèmes : pour cela il faudra pour suivre l'étude biochimique approfondie des glycoprotéines de différentes Origines, et ceci en parallèle avec l'étude immunologique quantitative.

C'est seulement une telle étude, qui dépasse de loin le sujet proposé pour cette thèse, qui pourra préciser quelle est dans la molécule la place occupée par les motifs antigéniques communs ou propres à l'espèce et à l'individu.

V. — *Rôle de la KGAG dans les problèmes des greffes*

De toutes les techniques immunologiques utilisées, celle qui pose le plus de problèmes est celle des greffes cornéennes.

Tout en tenant compte de la particularité de la cornée qui occupe une place à part parmi les organes (avascularisation), nous devons souligner que les résultats obtenus avec les greffes de cornée chez le lapin peuvent être comparés avec les faits connus sur l'immunologie des greffes en général. Ainsi la sensibilisation des animaux avec la KGAG est suivie d'accélération du rejet de la greffe.

Cela implique que les anticorps jouent un rôle dans ce phénomène de rejet. Comme le rejet est secondaire à la vascularisation et à l'opacification, on doit supposer que des complexes antigènes-anticorps se forment au niveau du greffon hétérologue et déterminent ainsi une série de phénomènes qui aboutissent au rejet : vascularisation, infiltration lymphocytaire.

D'autre part ce phénomène est strictement spécifique puisque l'injection de KGAG d'espèce homologue peut produire le rejet du greffon hétérologue tout en laissant intact le greffon homologue.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERTY (R. A.) and HEIDELBERGER (M.). — Fractionation and physical-chemical studies of a commercial preparation of the specific polysaccharide of type I pneumococcus. *J. of the American Chem. Soc.*, 1948, **70**, 211.
- AMINOFF (D.). — Methods for the quantitative estimation N-Acetyl-Neuraminic Acid. *Biochem. J.*, 1961, **81**, 384-392.
- ANDERSON (W. F.) and THOMAS (J. G.). — A simple colorimetric reaction for determination gamma-globulins content in antigen-antibody precipitation. *B.B.A.*, 1962, **58**, 558-562.
- ANSETH. — Glycosaminoglycans in the developing corneal stroma. *Exp. Eye Res.*, 1961, **1**, 116-121.
- BARNES (M. J.). — The isolation and characterization of a sialomucoprotein from human thoracic aorta. In structure and function of connective and skeletal tissue. Ed. by S. F. Jackson, R.D. Harkness, S. M. Partridge and G. R. Tristram, London. *Butterworths*, 1965, p. 145-151.
- BENACERAF (B.), HALPERN (B. N.), STIFFEL (C.), CRUCHAUD (S.) et BIOZZI (G.). — Phagocytose d'une fraction de sérum chauffé et iodé par le SRE. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 601-620.
- BERGMANN (I.) and LOXLEY (R.). — Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.*, 1961, **35**, 1961-1965.
- BETTHELEIM-JEVONS (F. R.). — Protein carbohydrate complexes. *Advance Protein Chem.*, 1958, **13**, 35-105.
- BOULANGER (P.), JAYLE (M. F.) et ROCHE (J.). — Biochimie du tissu conjonctif. *Exposés annuels de Biochimie Médicale*, 1953, t. **24**.
- BRIMACOMBE (J. S.) and WEBBER (J. M.). — Mucopolysaccharides, chemical structure, distribution and isolation. *Elsevier, Pub. Comp.*, Amsterdam, 1964.
- BUTLER (W. T.) and CUNNINGHAM (L. W.). — Evidence for the linkage of a disaccharide to hydroxylysine in tropocollagen. *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 3882.
- COMTE (P.). — Biochimie et physiologie du tissu conjonctif. *Centre Technique du Cuir*. Lyon, 1965.
- COMTE (P.), PARLEBAS (J.) et ROBERT (L.). — Composition en amio-acides des glycoprotéines de structure du tissu conjonctif. *C. R. Ac. Sciences* (sous presse), 1969.
- COONS (A. H.) and KAPLAN (M. H.). — Localization of antigen in tissue cells. Improvements in method for the detection of antigen by means of fluorescent antibodies. *J. Exp. Med.*, 1950, **91**, 1-16.
- COONS (A. H.). — Fluorescent antibody methods. In general cytochemical methods. Ed. J. F. Danielli. *Academic Press Inc.*, New York, 1958.
- COULOMBRE (A. J.) and COULOMBRE (J. L.). — Corneal development. Corneal transparency. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1958, **51**, 1-11.
- DISCHE (Z.). — A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.*, 1946, **167**, 189.
- DISCHE (Z.), DANILCZENKO and ZELMENIS. — Neutral heteropolysaccharides in connective tissue. In Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides. Ed. by Wolstenholme and M. O'Connor. *Boston Little, Brown and Co.*, 1958, 116-139.
- DISCHE (Z.). — In Methods in carbohydrate chemistry. Whistler, Wolfrom. *Acad. Press*. N. Y., 1962, 488.
- DOHLMAN (C. H.), WORTMAN (B.) and HULTMAN (S.). — Incorporation of sulfates 35-S N-acetylglucosamine-I-14C into calf and beef corneal glycosaminoglycans. *Invest. Ophthal.*, 1965, **4**, 867.
- DOHLMAN (C. H.). — Metabolism of the corneal graft. In S. Duke-Elder and E. S. Perkins : the transparency of the cornea. *Symposium Blackwell*, Oxford, 1960.
- DONN (A.). — Annual review Cornea and Sclera. *Arch. Ophthal. Chicago*, 1966, **73**, 278-294.
- DONN (A.). — Annual Review Cornea and Sclera. *Arch. Ophthal. Chicago*, 1966, **75**, 268-288.
- DORFMAN (A.). — Metabolism of acid mucopolysaccharides. *Biophys. J.*, 1964, **4**, 155-165.
- EASTOE (J. E.) and COURTS (A.). — Practical analytical methods for connective tissue proteins. *F. N. Spon.*, London, 1963.
- ELSON (T.) and MORGAN (W. T. J.). — A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1824.

- EYLAR (E. H.) and JEANLOZ (R. W.). — Oligosaccharides from the acid glycoprotein of human plasma. *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 622-628.
- FAURE (J. P.). — Les réactions immunologiques dans les greffes de la cornée. *Revue générale Arch. Ophth.*, Paris, 1964, **24**, 501-526, 603-620.
- FISKIN (A. F.) and BERENSON (G. S.). — Isolation of a glycoprotein from granulation tissue in rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **95**, 130-137.
- FITCH (S. M.), HARKNESS (M. L. R.) and HARKNESS (L. D.). — Extraction of collagen from tissues. *Nature*, 1955, **176**, 163.
- FITTON (M.). — Connective tissue cells. In the cell Ed. by J. Brachet and A. E. Mirsky. *N. Y. Acad. Press Inc.*, 1964, 387-520.
- GALLOP (P. M.), SEIFTER (S.) and MEILMAN (E.). — Studies on collagen. The partial purification assay and mode of activation of bacterial collagenase. *J. Biol. Chem.*, 1957, **227**, 891.
- GIBBON (R. A.). — Physical-chemical methods for the determination of purity, molecular size and shape of glycoproteins. Ed. by A. Gottschalk, *Elsevier Pub. Comp.*, Amsterdam, 1966, 29-94.
- GOLDSTEIN (G.), SLIZYS, CHASE (M. W.). — Studies on fluorescent antibody staining. Non specific fluorescence with fluorescein coupled sheep anti-rabbit globulins. *J. Exp. Med.*, 1961, **114**, A, 89.
- GOLDSTEIN (I.), REBEYROTTE (P.), PARLEBAS (J.) and HALPERN (B. N.). — Isolement par digestion enzymatique, à partir de valvules cardiaques de Bœuf, d'un glycopeptide ayant une parenté immunologique avec le polysaccharide du streptocoque du groupe A. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1968, **266**, 1091-1094.
- GOTTSCHALK (A.). — The chemistry and biology of sialic acid and related substances. *Cambridge University Press*, 1960.
- GOTTSCHALK (A.). — Glycoproteins, their composition, structure and function. *Elsevier Pub. Comp.*, Amsterdam, 1966.
- GREGORY (J. D.), LAURENT (T. C.) and RODEN (L.). — Enzymatic degradation of chondromucoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 3312-3320.
- GROSS (J.). — Comparative biochemistry of collagen, in comparative biochemistry Ed. by M. Florkin and H. S. Mason, 307-346. *N. Y. Acad. Press Inc.*, 1963.
- HALPERN (B. N.), JACOB (M.), BINAGHI (R.) et PARLEBAS (J.). — Mise en évidence et dosage des anticorps allergiques par l'hémagglutination passive *in vitro* dans les syndromes allergiques humains et expérimentaux. *Rev. Franç. d'Allergie*, 1961, **1**, 201-214.
- HEFTMANN (E.). — Chromatography. Ed. by E. Heftmann, 139-163, 164-181. *Reinhold Pub.*, N. Y., 1961.
- HEIDELBERGER (M.) and KENDALL (F. E.). — A quantitative theory of the precipitin reaction. *J. Exp. Med.*, 1935, **62**, 467-483.
- HERRING (G. M.) and KENT (P. W.). — Some studies of mucosubstances of bovine cortical bone. *Biochem. J.*, 1963, **89**, 405-414.
- HERRING (G. M.). — Mucosubstances of cortical bone. Proc. 1st Eur. Bone and tooth Symposium, Ed. by H. J. J. Blachwood, Oxford, 1964, 263-268.
- HIRANO (S.), HOFFMAN (P.) and MEYER (K.). — The structure of keratosulfate of bovine cornea. *J. Org. Chem.*, 1961, **26**, 5064-5069.
- HOSKINS (L.) and ZAMCHECK (N.). — Studies in gastric mucins. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1963, **106**, 767-774.
- JAKUS (M. A.). — The fine structure of the human cornea. In the structure of the eye. *Acad. Press N. Y.*, London, 1961, 343-366.
- JAKUS (M. A.). — Further observation in the fine structure of the human cornea. *Invest. Ophth.*, 1962, **1**, 202-225.
- JAKUS (M. A.). — Ocular fine structure selected electron micrographs. *Churchill*, London, 1964.
- KABAT (E.) and MEYER (M.). — Nitrogen determination. *Exp. Immunochem.* (seconde édition), C. Thomas, U.S.A., 1961, 476.
- KALISS (N.). — Immunological enhancement of tumor homographs in mice. *A review cancer Res.*, 1958, **18**, 992.
- KENT (P. W.). — Structure and function of glycoproteins in *Essays in Biochem.*, 1967, **3**, 105-152.
- KING (J. H.) and McTIGUE (J. W.). — The cornea world Congress. *Butterworths*, Washington, 1965.
- LOWRY (O.), ROSEBROUG (H.), FARR (N. J.) and RANDALL (R. J.). — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. of Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-275.
- MATHEWS (M. B.). — The interaction of collagen and acid mucopolysaccharides. A model for connective tissue. *Biochem. J.*, 1965, **96**, 710-716.
- MAURICE (D. M.). — The structure and transparency of the cornea. *J. Phys. London*, 1957, **136**, 263-286.
- MAURICE (D. M.). — The transparency of the cornea. Symposium Blackwell, Oxford (*Masson*). 1960, 67-69.
- MEYER (K.), LINKER (A.), DAVIDSON (E. A.) and WEISMANN (B.). — The mucopolysaccharides of bovine cornea. *J. Biol. Chem.*, 1953, **205**, 611-616.
- MEYER (K.) and ANDERSON (B.). — The chemical specificity of the mucopolysaccharides of the cornea. *Exp. Eye Res.*, 1965, **4**, 346-348.
- MOCZAR (E.) et MOCZAR (M.). — Nouvelle microméthode pour l'étude de la structure de la fraction glucidique des glycoprotéines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1967, **49**, 8-9, 1159.

- MOCZAR (E.), MOCZAR (M.) et ROBERT (L.). — The finger printing of the oligosaccharides derived from the partial hydrolysis of the glycoproteins of the connective tissue. *Biochem. J.*, 1967, **104**, 2-17.
- MOCZAR (E.), MOCZAR (M.), SCHILLINGER (G.) and ROBERT (L.). — A rapid micro-determination of neutral sugars and aminosugars in glycopeptides by thin-layer chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1967, **28**, 380.
- MONTREUIL (G.) et SPIK (G.). — Deux causes d'erreurs dans le dosage colorimétrique des oses neutres totaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, **46**, 731-749.
- MOORE (S.) and STEIN (W. H.). — A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino-acids and related compounds. *J. Biochem.*, 1954, **211**, 907-926.
- MOORE (S.) and STEIN (W. H.). — In *Methods in enzymology*. Ed. S. Colowick and N. Kaplan, Acad. Press N. Y., 1964, **6**, 819.
- MUIR (H.). — Chemistry and metabolism of connective tissue glycosaminoglycans, in *International review of connective tissue research*. Ed. by D. A. Hall, N. Y. Acad. Press, 1964, **2**, 101-154.
- OUCHTERLONY (O.). — Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progress in allergy*, S. Karger, Basel, 1958, **5**, 1-77.
- PARK (J. T.) and JOHNSON (M. J.). — A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 1949, **181**, 149.
- PARTRIDGE (S. M.). — Filter paper partition chromatography of sugars. *Biochem. J.*, 1948, **42**, 238-241.
- PARTRIDGE (S. M.). — La nature chimique de l'élastine. In *Exp. Ann. Bioch. Med.* (Masson et Cie, Paris), 1953, **24**, 133.
- PARTRIDGE (S. M.), and ELSDEN (D. F.). — The chemistry of connective tissue. Dissociation of the chondroitin-sulfate-protein complex with alkali. *Biochem. J.*, 1961, **79**, 26-32.
- PAYRAU (P.). — In : *Biochemistry and immunochemistry of the cornea. Symposium on biochemistry of the Eye*. Tutzing, 1966.
- PAYRAU (P.), POULIQUEN (Y.) et FAURE (J.-P.). — Hétérogreffes de la cornée. Études expérimentales et premiers résultats chimiques. *Ann. Ocul.*, 1961, **194**, 1-30, 123-132.
- PAYRAU (P.), POULIQUEN (Y.), FAURE (J. P.) et OFFRET (G.). — La transparence de la cornée. *Soc. Franç. Ophl.* (Masson et Cie, Paris), 1967.
- PIRIE (A.) and HEYMINGEN (R. Van). — *Biochemistry of the Eye*. Blackwell, Oxford, 1956.
- POLICARD (A.) et COLLET (A.). — *Physiologie du tissu conjonctif normal et pathologique*. Masson et Cie, Paris, 1961.
- POULIQUEN (Y.). — Morphologie et ultrastructure du stroma cornéen normal. *Bull. Soc. Ophl.*, 1963, 818-822.
- PRESS (E. M.) and PORTER (R. R.). — Immunoglobulins in : *Glycoproteins*. Ed. by Gottschalk (Amsterdam, Elsevier), 1966, 395-412.
- RANDALL (J. T.). — Nature and structure of collagen. *Acad. Press.*, N. Y., 1953.
- RADHAKRISHNAMURTHY (B.), FISKIN (A. F.), HUBBEL (G. H.) and BERENSON (G. S.). — Further studies of glycoproteins from a cardiovascular connective tissue. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1964, **104**, 19-26.
- ROBERT (L.) and DISCHE (Z.). — Analysis of a sulfated sialofucoglucosaminogalactomannosidoglycan from corneal stroma. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1963, **10**, 209-214.
- ROBERT (B.), PARLEBAS (J.) et ROBERT (L.). — Étude immunochimique d'une glycoprotéine de la cornée, la kératoglycosaminoglycane. *C. R. Acad. Sci.*, 1963, **256**, 232.
- ROBERT (L.), PARLEBAS (J.), POUILLAIN (N.) et ROBERT (B.). — Données nouvelles sur l'immuno-chimie des protéines fibreuses du tissu conjonctif. In : *Protides of the biological fluids*. Ed. by H. Peeters (Elsevier, Amsterdam), 1963, **2**, 109-116.
- ROBERT (L.) et PARLEBAS (J.). — Biosynthèse *in vitro* des glycoprotéines de la cornée. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, **47**, 1853-1866.
- ROBERT (L.), PAYRAU (P.), POULIQUEN (Y.), PARLEBAS (J.) and ROBERT (B.). — Role of a structural glycoprotein of corneal stroma in transplantation immunity. *Nature*, London, 1965, **207**, 383-385.
- ROBERT (L.) et PARLEBAS (J.). — Études sur la biosynthèse des glycoprotéines tissulaires, in : P. Comte, *Biochimie et Physiologie du tissu conjonctif*. Centre Technique du Cuir, Lyon, 1965, 81.
- ROBERT (L.) et ROBERT (B.). — Biochimie et immunochimie des glycoprotéines de structure de la trame conjonctive. *Médecine et Hygiène*, 1965, **23**, 1-11.
- ROBERT (L.) et PARLEBAS (J.). — Purification et composition chimique d'une glycoprotéine de la cornée, la kératoglycosaminoglycane. *Biochem. Biophys. Acta*, 1968 (sous presse).
- ROBERT (L.) et COMTE (P.). — Aminoacid composition of structural glycoproteins. *Life Sciences*, 1968, **7**, 493-497.
- RODEN (L.). — The protein-carbohydrate linkage in protein complexes of acid mucopolysaccharides. *Abst. of the 148 th Meeting of the American Chemical Society, Chicago*, 1964, p. 12 C.
- SMELSER (G. K.). — The structure of the Eye. *Symposium Academic. Press*, N. Y. London, 1961.
- SPIRO (R. G.). — Glycoproteins : structure, metabolism and biology. *New. Engl. J. Med.*, 1963, **269**, 616-621.
- STEVEN (F. S.). — Multiple stage depolymerisation of collagen fibrils. *B.B.A.*, 1966, **130**, 202-216.
- SVENNERHOLM (L.). — Quantitative estimation of sialic acids. A colorimetric resorcinol. Hydrochloric acid method. *Biochem. Biophys. Acta*, 1957, **24**, 604-611.

- TENG (C. C.). — The fine structure of human corneal. *J. Ophth.*, 1963, **54**, 969-1002.
- THOMAS (C. I.). — The cornea. *Charles C. Thomas*, Springfield, Ill., 1955.
- TILLMANS (J.) and PHILIPPI (K.) modified by RIMINGTON. — Seromucoid and the bound carbohydrate of the serum proteins. *Biochem. J.*, 1940, **34**, 931.
- TISELIUS (A.). — Some applications of the separation of large molecules and colloidal particles. *J. Chem. Soc.*, 1954, **2**, 2650.
- UNDERWOOD (A.) and ROCKLAND. — Small-scale filterpaper chromatography. *Anal. Chem.*, 1954, **26**, 1553.
- WAGNER (B. M.) and SMITH (D. E.). — The connective tissue (monograph), *Williams and Wilkins Cie*, Baltimore, 1964.
- WHISTLER (R. L.) and WOLFROM (M. L.). — Method in carbohydrate chemistry. *Acad. Press*, N. Y., 1962, 130.
- WILSON (A. T.). — Tritium and paper chromatography. *Nature*, 1958, **182**, 524-525.
- WOLSTENHOLM (G. E.). — On the chemistry and biology of mucopolysaccharides. *Ciba Fdn. Symposium*. London, *Churchill*, 1958.
-

FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

9, QUAI SAINT BERNARD - PARIS V^e

SERVICE DE LA SCOLARITÉ

Bureau des Enseignements du 3^e Cycle

TÉLÉPHONE 336-25-25 - P

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : D'UNIVERSITÉ

THESE DE :

Nom : PARIEBAS

Prénoms : Janine

Né (e) le 29 Décembre 1927 à PARC SAINT-MAUR Dép^t Seine

SUJETS

1ère THESE : Etude chimique et immunologique d'une nouvelle glycoprotéine de la cornée

2e THESE (Propositions faites par la Faculté) : Etude comparative des glycoprotéines dans différents tissus d'origine conjonctive.

Vu et approuvé

Paris, le 26 Juin 1969

Le Doyen de la Faculté
des Sciences de Paris

Vu et permis d'imprimer

Paris, le

Le Recteur de l'Académie
de Paris



L. Gauthier

